

VERFAHREN ZUM NACHWEIS VON REAKTIONEN MITTELS KOINZENZANALYSE

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von Assoziations-, Dissoziations-, Verknüpfungs- oder Spaltreaktionen sowie Konformationsänderungen mittels Koinzidenzanalyse.

Das Auffinden von Molekülen mit spezifischen Eigenschaften, wie Bindungs-, Imitations- oder katalytischen Eigenschaften, ist eine zentrale Aufgabe in der Wirtschaftsentwicklung und in biotechnologischen Anwendungen. Moleküle mit denartigen Eigenschaften können entweder entdeckt oder entworfen werden. In diesem Sinne bedeutet "Entdecken" die Isolierung und das Screening von Substanzen, während das molekulare Design auf rationale oder evolutive Techniken zurückgreift. Das rationale Design erfordert fundierte Einblicke in die molekulare Biophysik, um eine Vorhersage der Struktur-funktion-Beziehung zu ermöglichen. Im Gegensatz dazu werden im evolutionären Design Prinzipien der Darwinischen Evolution auf molekularer Ebene angewendet und neue bzw. veränderte Modelle durch eine Kombination von Mutation, Amplifikation und Selektion erzeugt. Die Anwendung evolutionärer Techniken in der Biotechnologie - sog. evolutive Biotechnologie - wurde von Eigen und Lindner zu Beginn der achtziger Jahre vorgeschlagen (Pure Appl. Chem. 56, 967/978, 1984) und hat inzwischen eine breite Akzeptanz gefunden. Leider ist jedoch in vielen evolutionären Ansätzen der Prozess der Selektion nicht unmittelbar an die Amplifikation geknüpft. Selektionsprozesse müssen daher oftmals künstlich eingeführt werden. Dies kann beispielsweise im

sog. Hochdurchsatzscreening (HTS) in Kombination mit einem geeigneten Assay erfolgen.

HTS-Prozesse unterliegen ökonomischen Beschränkungen. Zur Prozessierung einer Vielzahl von Proben ist es daher erforderlich, daß die Analysezeit der einzelnen Probe extrem gering ist. In den letzten Jahren erfolgten daher große Anstrengungen in der Miniaturisierung, Parallelisierung und Automatisierung der Screeningtechniken sowie in der Entwicklung von homogenen Assays und der Integration hochsensitiver und schnell arbeitender Detektionsvorrichtungen. Unter der Vielzahl alternativer Detektionsprinzipien haben fluoreszenzbasierte Techniken - wie Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET), Fluoreszenzquenchung, Fluoreszenzpolarisation, zeitaufgelöste Fluoreszenzdetektion und Fluoreszenzkoinzidenzspektroskopie (FCS) - starken Anklang gefunden.

Im Rahmen der Fluoreszenzkoinzidenzspektroskopie werden Fluoreszenzfluktuationen von einzelnen Molekülen eines insbesondere im hemolysierten Bereich liegenden Medizinenkomplexes gemessen und z. B. durch Evaluierung der Autokorrelationsfunktion der Einfacher-Fluoreszenzsignale molekulare Diffusionscharakteristika ermittelt. Die Grundlagen der FCS und ihre Anwendung auf insbesondere biologische Fragestellungen sind in vielfältigen Artikeln und Patentanmeldungen beschrieben (z. B. Eigen und Rigler, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 5740 - 5747, 1994; WO 94/6313).

Die Fluoreszenzkoinzidenzspektroskopie oder sog. Zweifach-FCS ist ebenfalls Gegenstand einiger Veröffentlichungen. Die Zweifach-FCS wurde zu Beginn der neunziger Jahre von Eigen und Rigler (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 5740 - 5747) vorgeschlagen und wird ebenfalls in der unter WO 94/6313 veröffentlichten internationalen Patentanmeldung erörtert. Applikationen dieser Technik bei der Untersuchung von Hybridisierungseigenschaften wurden von Schwille et al

(Biophysical Journal, Vol. 72, 1878 - 1886, 1997) beschreiben. Die in der Literatur beschriebenen Anwendungen der Fluoreszenzkorrelations zeigen, daß Analysenzeiten von 30 bis 120 s notwendig sind, um eine hinreichend genaue Bestimmung der Amplituden der Kreuzkorrelationsfunktion und Diffusionskoeffizienten zu ermöglichen. Derartige lange Analysenzeiten sind nicht oder nur bedingt für ein Hochdurchsatzscreening geeignet.

In der Literatur sind ferner verschiedene Signalvererkennungsverfahren beschrieben worden, um Signale vom Hintergrundrauschen zu trennen.

In Tellingshausen et al. (Analytical Chemistry 66, No. 1, 64 - 72, 1994) wird ein Verfahren für die Fluoreszenz/Lebensdauerpektroskopie beschrieben, das dazu dienen soll, die von der Lichtquelle, in diesem Fall von einem Laser stammenden Phänomen aus dem Gesamtsignal herauszufiltern. Dazu wird der Signalfrequenzstrom mit dem Triggersignal, d.h. dem Anregungspuls des gepulsten Lasers, verglichen. Kommt ein Photon im Rahmen der Lichtgeschwindigkeit zeitgleich mit dem Anregungspuls an, so wird es als Streulichtpuls identifiziert und gelöscht.

In Keller et al. (Applied Spectroscopy 50, No. 7, 12A - 32A, 1996) wird ein weiteres Verfahren für die Analyse von Fluoreszenzlebensdauern beschrieben. In diesem Verfahren werden die Zeitdifferenzen zwischen am Detektor eintriefenden, zeitlich aufeinanderfolgenden Impulsen bestimmt, indem die Anzahl von Triggerpulsen, die mit 100 MHz erzeugt werden, zwischen zwei aufeinanderfolgenden Phasen gezählt wird. Diese Zahlen werden in aufeinander folgenden Kanälen eines MCS-Signal einer "multichannel scaler" gespeichert. Anschließend wird dieses MCS-Signal einer zeitlichen, schnellen Fouriertransformation (FFT) zur Glättung unterworfen. Liegen nach der FFT wenigstens 5 Zeitdifferenzen des geordneten Signals unterhalb eines visuell bestimmten Schwellenwertes, so wird das Signal für die gesamte Zeilauerzeit während der die Zeitdifferenzen kontinuierlich unterhalb des visuell bestimmten

Schwellenwertes liegen, als zusammengehörend erachtet und als Fluoreszenzanteil, im wissenschaftlichen Sprachgebrauch seit einiger Zeit "burst" genannt, bewertet. Anschließend wird das so gefilterte Signal in Bezug auf die Fluoreszenzlebensdauer ausgewertet. Allerdings verwenden die Autoren hier nur Signaleanteile, bei denen mehr als 25 Zeitdifferenzen unterhalb des visuell bestimmten Schwellenwertes liegen.

Aufgabe der folgenden Erfindung ist es, ein Verfahren bereitzustellen, welches bei kleinsten Probenvolumina eine zuverlässige und schnelle Detektion von Assoziations-, Dissoziations-, Verknüpfungs- und Spaltreaktionen sowie Konformationsänderungen ermöglicht.

Die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren mit den Merkmalen des Patentanspruchs 1. Die weiteren Patentansprüche betreffen bevorzugte Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens.

Die Erfindung betrifft somit ein Verfahren zum Nachweis von Assoziations-, Dissoziations-, Verknüpfungs- oder Spaltreaktionen sowie Konformationsänderungen von Analyten in einer Probe mittels Konzentrationen, wobei

- die Probe mindestens zwei mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markierte Analyte und/oder mindestens einen mit mindestens zwei unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markierten Analyten enthält,
- die Probe zur Anregung der Fluoreszenzemission der mindestens zwei Farbstoffe von mindestens einem Laser beleuchtet wird,
- die von der Probe ausgehenden, aus mindestens einem Mehrkomponenten-Versammlenden Fluoreszenzsignale mittels mindestens zweier Detektoreinheiten detektiert werden.

die jeweils in den Detektionseinheiten detektierten Signale oder hiervon abgeleitete Zeitgruppen in beliebiges, im wesentlichen jedoch simultanes, Zeitabschnitt mit frei wählbaren Zeitkanalbreiten zerlegt werden, schneidet man in mindestens einem Zeitabschnitt enthaltenen Signale die Anzahl der in mindestens einem Zeitabschnitt ermittelten und/oder die Zeitintervalle zwischen Signalen in den Zeitabschnitten ermittelt werden.

Man ermittelt einen Zeitabschnitt der ersten Detektionseinheit eine Konzentranzanalyse der ermittelten Daten mit mindestens einem im wesentlichen zeitgleichen/zeitabschnitt der zweiten Detektionseinheit durchgeführt wird, mindestens eine Statistik der Resultate der Konzentranzanalyse erstellt wird, und/oder die Resultate einer Schwellenwertanalyse unterzogen werden, diese oder mindestens eine Kombination mehrerer Statistiken nach dem Vorhandensein von Merkmalen, welche für eine Assoziations-, Dissoziations-, Verknüpfungs- oder Spaltreaktion oder Konformationsänderungen charakteristisch sind, bewertet wird.

Weiterhin kann es bevorzugt sein, daß die Zeitkanalbreiten größer als die längste Fluoreszenzlebensdauer der mindestens zwei Farbstoffe sind und/oder die Zeitkanalbreiten kleiner als die Durchlaufzeit des mindestens einen Probenvolumens durch das Meßvolumen sind.

Diese Detektionseinheiten sollten in einer bevorzugten Ausführungsform unterschiedliche spektrale Detektionsempfindlichkeiten aufweisen.

Weiterhin sollte das Meßvolumenelement $V < 10^{-12}$ l betragen.

Es kann weiterhin bevorzugt sein, die Probe mittels eines Lasers zu beleuchten, der elektromagnetische Strahlung mindestens einer Wellenlänge emittiert, die geeignet ist, die mindestens zwei in der Probe enthaltenen Farbstoffe anzuregen. Es ist jedoch

auch möglich, Laser zu verwenden, die mehr als eine Wellenlänge emittieren, oder mehrere Laser zur Anregung der Fluoreszenzemission einzusetzen.

Es kann ebenfalls bevorzugt sein, daß die Konzentranzanalyse online durchgeführt wird und/oder die Zeit zur Durchführung der jeweiligen Messung während der Messung individuell angepaßt wird.

Weiterhin kann es bevorzugt sein, im Rahmen der Konzentranzanalyse die Konzentranz durch Bestimmung der Amplitude $G(t)$ der Kreuzkorrelationsfunktion zu ermitteln.

Es kann ebenfalls bevorzugt sein, im Rahmen der Konzentranzanalyse die Konzentranz durch logische UND-Verknüpfung zu ermitteln.

Weiterhin kann es wünschenswert sein, die Konzentranz durch Multiplikation gemäß nachfolgender Formel zu ermitteln:

$$K_i(t) = \frac{\sum_j M(n_i, j)}{\prod_j M(n_i, j)} \cdot n_i^{-1}$$

wobei $M(n_i, j)$ die Anzahl Photonen im Zeitabschnitt n_i des Detektors j , i die Gesamtzahl der verwendeten Detektionseinheiten und n die Anzahl der Zeitabschnitte innerhalb der Zeitspur bedeuten.

Es kann auch wünschenswert sein, daß Probenvolumen und Meßvolumen relativ zu einander bewegt werden.

Weiterhin kann es bevorzugt sein, Systeme zu untersuchen, in denen Partikel auftreten, deren Molekulargewicht sich um weniger als den Faktor 2 unterscheidet.

Vorzugsweise umfaßt die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens zunächst die Markierung der zu untersuchenden Problemoleküle durch mindestens zwei mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markierte Analyse und/oder einen mit mindestens zwei unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markierten Analysen.

Die spektral unabhängigen Emissionsspektren der mindestens zwei unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffe werden in einem korrelativen Nachweissystem auf unabhängigen Detektoren detektiert, wobei vorzugsweise jedem Farbstoff ein Detektor zugeordnet wird. Die auf den Detektoren erzeugten Photosignale werden von einer Melkareineinheit in getrennten Zeitspuren für Detektoren aufgenommen und vorzugsweise parallel bzw. simultan mit frei wählbaren Zeitkanälen korreliert. Es werden somit bevorzugt synchronisierte Zeitschichten bereitgestellt, die in frei wählbare Zeitkanäle unterteilt sind und in welchen die Photosignale je nach zeitlichen Einheiten gespeichert werden.

Es wird erfindungsgemäß die über das statistische Mittel hinausgehende Häufigkeit am korreliert in den synchronisierten Zeitspuren auftretenden Signalen mittels eines geeigneten Algorithmus berechnet. In einer bevorzugten Ausführungsform wird diese Korrelation K durch eine normierte Multiplikation der verwendeten Detektorwerte mit frei wählbarer zeitlicher Auflösung berechnet. Hierzu werden bevorzugt jeweils zugehörige Kanäle dieser Zeitspuren der verwendeten spektral getrennten Detektorwerte $j = 1, \dots, n$ miteinander multipliziert, anschließend die Summe über alle Produkte gebildet und diese normiert und mit der Gesamtzahl n der in einer Zeitspur enthaltenen Zeitkanäle bzw. Zeitschichten multipliziert.

$$K(n) = \frac{\sum_j M(n, j)}{\sum_j N(n, j)} \cdot n^{n-1}$$

Hierbei bezeichnet $M(n, j)$ die Anzahl Photonen im Zeitkanal n des Detektors j , j die Gesamtzahl der verwendeten Detektorkanäle bzw. Detektorchenn und n die Anzahl der Zeitkanäle bzw. Zeitschichten innerhalb der Zeitspur.

Der so erhaltene Wert K ist ein mögliches Bewertungsmaß für die untersuchte Probe. Für völlig voneinander unabhängige Signale ist $K=1$. Werden in den mindestens zwei Zeitspuren über das Zufallsmaß hinausgehend zeitgleich Photonen detektiert, ist $K>1$. Je höher K über 1 liegt, desto mehr Korrelationen in den beiden Zeitspuren treten auf, d. h. desto mehr Problemoleküle mit mindestens zwei Farbstoffen werden detektiert. In Abhängung 9 ist dieses Melkprinzip am Beispiel einer Probe, die zwei unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe enthält, verdeutlicht.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren ist es somit noch notwendig eine Korrektur an durchzuführen, wie es z. B. eine fundamentale Voraussetzung für die Einfärbung des FCS ist. Gleichzeitig entbirgt sich das für die FCS unerlässliche Anhalten der Melkuren. Weiterhin kann so die anfängliche Menge an Daten auf das Minimum von einem Wert pro Probe reduziert werden (z. B. ist $K_2 > 1$ durch proportional zur Konzentration an doppelt markierten Molekülen).

Ein besonders hervorzuhebender Vorteil für die Entwicklung von homogenen Assays auf der Basis des erfindungsgemäßen Verfahrens in die generelle Anwendbarkeit und Flexibilität der Methode. Das Targetdesign beispielsweise für konventionelle Einfärbungen des FCS ist limitiert durch die Notwendigkeit, positive und negative Ionen über die Diffusionszeiten der fluoreszenten Moleküle zu unterscheiden. Andere Fluoreszenztechniken wie FRET oder Fluoreszenzquenchung sind dadurch

eingeschränkt, daß zwei Fluorophore sich in getrennter räumlicher Nähe zueinander befinden müssen. Sie können jedoch nach Nachweis von Kontaminationsänderungen durchaus geeignet sein. Fluoreszenzpolarisation erfordert eine veränderte Fluorophorelektrolyt, um eine Reaktion detektieren zu können. Auf dem erfindungsgemäßen Verfahren basierende Assays unterliegen nicht diesen Limitationen. Das Screening auf enzymatische Aktivität sowie auch auf inhibitorien enzymatischer Prozesse wird entscheidend vereinfacht. Unter Anwendung der Prinzipien der evolutionären Hochdurchsatz- in Kombination mit dem erfindungsgemäßen Verfahren und neuen Mutagenese-techniken eröffnen sich Möglichkeiten für das Design bzw. die Optimierung einer Vielzahl katalytischer Funktionen.

Abhängig von der gewünschten Toleranz für falsch-positive bzw. falsch-negative Resultate ist es möglich mittels des erfindungsgemäßen Verfahrens Analysereihen von weit unter 1,3 zu erreichen. Das erfindungsgemäße Verfahren ist ein hochzeitiges, so daß ein *on-line* Fitting während der Messung möglich ist. Im Falle des Screenings auf Resistenzendotoxinaktivität sollten i.d.R. die meisten Proben negativ sein, da eine spezifische Enzymaktivität in einer beliebigen Library ein relatives seltenes Ereignis darstellt. Bei Verwendung einer Gauß'schen Funktion für positive Proben und Festsetzung einer Toleranzschwelle, welche die Anzahl nicht-identifizierter positiver Proben in einem Screeninglauf definiert, kann ein Schwellenwert für die Konzentration für eindeutig negative Proben definiert werden. Alle Proben mit einem Konzentrationenwert unterhalb dieses Schwellenwertes können unmittelbar einer weiteren Analyse mit derselben Analysereihe zugeführt werden. Es resultiert somit eine verdoppelte Analysereihe für die wiederum ein Schwellenwert definiert wird. Da die Verteilungsfunktionen bei Verteilungen dieser Analysereihen signifikant besser separiert sind, werden die meisten Proben als falsch-positiv identifiziert. Positive Proben werden nachfolgenden Analysen zugeführt, bis die gewünschte Signifikanz erreicht ist. Es ist somit möglich, mit ein Umzettel zu bestimmenden Analysereihen

unter Zugrundelegen eines gewünschten Signifikanzniveaus eine adaptive Auswertung durchzuführen (siehe z. B. Figuren 3 und 6).

Das erfindungsgemäße Verfahren und seine Ausführungsformen zeichnen sich durch folgende Vorteile aus:

Bei Irzeugung eines zweifelhafte Auswegungsmittels in nur einer Leuchtquelle wird ein geringerer Juagengrunds erforderlich. Es ergibt sich eine Erhöhung der Substanz bezuglich der Deckungsgleichheit der beiden kontrastalen Volumenelemente. Störende Wellenlängen außerhalb der spektralen Anregungsgebiete bzw. innerhalb der Emissionenbereiche der beiden Marker-Fluorophore können durch geeignete optische Filter herausgefiltert werden. Eine Anpassung der relativen Intensitäten und Strahlendurchmesser für beide Farben kann ebenfalls unter Verwendung geeigneter Filter und Lochblenden erfolgen.

Ein grundlegender Vorteil des beschriebenen Verfahrens ist die Möglichkeit der sehr schnellen Charakterisierung. Höher erreichbare Meßzeiten liegen im Bereich von wenigen Millisekunden pro Probe. Für die Ermittlung des Meßwertes K ist die fundamentele untere zeitliche Grenze die Lebensdauer der verwendeten Fluorophore, im Gegensatz etwa zur Fluoreszenz-Korrelationsanalyse, wo die Bestrahlung durch die Durchtrittszeit der zu untersuchenden Biomoleküle durch das Meßvolumen (=Diffusionszeit) gegeben ist.

Ein weiterer Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens der Konzentration-Analyse liegt in der Möglichkeit der Auswertung der Meßdaten während der Datenaufnahme (*on-line*) mit Hilfe einer geeigneten Meßwertauswertungsvorrichtung. Im Gegensatz z. B. zur Fluoreszenz-Korrelationsanalyse entfällt eine mathematische Modellierung.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird die Meldezit online angepaßt. Dieser adaptive Meldezitalgorithmus ermöglicht eine weitere Reduzierung der Gesamtmeßzeit. Vorzugsweise bei Zeiten, die kürzer sind als die mittlere notwendige Meldezit wird die Eindringtiefe des Ergebnisses geprüft. Dies kann beispielsweise dadurch geschehen, daß geprüft wird, ob der zu diesem Zeitpunkt ermittelte Konzentrationswert eindeutig positiv oder negativ eintrifft in Figur 7 bzw. Figur 8 dargestellten Gaußverteilung für positive oder negative Proben zugesendet werden kann. Alle Proben mit einem Konzentrationswert unterhalb oder ggf. oberhalb eines festzulegenden Schwellenwertes können unmittelbar einer weiteren Analyse zugeführt werden. Diese Angabe eines bestimmten Signifikanzniveaus kann ebenfalls zu einer erheblichen Verkürzung der Meldezit führen.

Es erfüllen ebenfalls experimentelle Realitäten zur Kalibrierung des Systems wie sie z. B. bei der Fluoreszenz-Korrelationsanalyse notwendig sind.

In einer weiteren Ausführungsform wird die für die Konzentrationsanalyse nötige Fluoreszenzintensität durch eine kontrollierte Bewegung der Probenmoleküle relativ zum konfokalen Volumen bewirkt. Technisch wird dies entweder durch eine Bewegung der Probe (Überschiebung von Schwingungen oder Induktion eines Flusses) bei stationärer Optik, oder durch Bewegung des Meldefokus in der stationären Probe (konfokales Scanning), oder durch eine Kombination von beidem erreicht. Gegenüber den in der PCS üblichen Fluktuationen aufgrund molekularer Diffusion erlaubt die kontrollierte Bewegung der gezielte Einstellung der für die Fluoreszenzdetektion optimalen Aufenthaltswahrscheinlichkeit eines Moleküls im Fokus. Damit läßt sich die Anzahl der Fluktuationen pro Zentimeter gezielt erhöhen, was eine deutliche Steigerung der Signaleigenschaft mit sich führt. Zusätzliche Effekte bestehen in der Vergrößerung des effektiven Meßvolumens, was in a) die Sensitivität der Methode erhöht und zu Reduktion des Photobleichings führt, sowie in der Vereinfachung

der Aufenthaltswahrscheinlichkeit eines Moleküls für verschiedene Moleküle, was die Signaleigenschaft reduziert.

Demonstriert wurde die Variante einer gesteuerten Bewegung der Probe bei stationärer Optik in Form der Überschiebung von Schwingungen. Hierzu wurde der Probenmittelpunkt an einem piezoelektrischen Positionierschritt montiert und z.B. mit Frequenzen bis zu 250 Hz oszillierend in der Kammerbewegung senkrecht zur optischen Achse bewegt. Bereits bei Frequenzen zwischen 100 und 200 Hz ergab sich ein deutlich erhöhtes Signal-zu-Hintergrund Verhältnis mit einer damit einhergehenden Verringerung der für eine Bewertung notwendigen Meldezit.

Es konnte ebenfalls gezeigt werden, daß die zeitliche Breite der Zeitanalyse und die Frequenz der periodischen Relativbewegungen die Meßwerte vorteilhaft beeinflussen können. Es zeigte sich (Figur 10), daß die Zeitanalysebreite vorzugsweise größer als die Taktzeitstand-Lebensdauer der Fluorophore und/oder kleiner als die mittlere Durchlaufzeit der Moleküle durch das Meßvolumen gewählt werden sollte.

Ein weiterer, fundamentaler Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens der Konzentrationsanalyse besteht in der Möglichkeit, auch Systeme untersuchen zu können, in denen Partikel auftreten, deren Molekulargewicht sich um weniger als den Faktor 2 unterscheidet. Untersucht man solche Systeme z. B. mit der Fluoreszenz-Korrelationsanalyse, in welcher die Diffusionszeiten bestimmt werden, so führt dies zu Problemen in der Eindringtiefe der Untersuchung. Im erfindungsgemäßen Verfahren durch die Bestimmung der Konzentration zwischen Zeitpunkten von speziellem Detektor ist hingegen eine eindeutige Unterscheidung möglich.

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens kann die Konzentration auch durch Bestimmung der Amplitude $G(t)$ der Kreuzkorrelationsfunktion erfolgen. Die Amplitude $G(t)$ reicht aus, Aussagen über die Konzentration

des zu untersuchenden Modells machen zu kommen und so, wie z. B. in dem Ausführungsbeispiel 1 und in Figur 5 dargestellt, die Aktivität einer Restriktionsendonuklease zu bestimmen.

Die Komplexanalyse kann in einer weiteren Ausführungsform auch durch ein logisches (IND) bzw. Multiplikationsglied auf hardwaretechnisch realisiert werden.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren läßt sich darüber hinaus auch die Substratkonzentration bis in den subpikomolaren Bereich verringern.

Figur 1 zeigt typische Kreuzkorrelationskurven, die von Proben mit bzw. ohne Restriktionsendonukleaseaktivität bei verschiedenen Analysenzeiten erhalten wurden.

Figur 2 zeigt die Mittelwerte der jeweiligen einzelnen Kreuzkorrelationspunkte und ihre Standardabweichungen, die von Proben mit bzw. ohne Restriktionsendonukleaseaktivität unter Verwendung von leuchtenden unterschiedlichen Durchmessern erhalten wurden.

Die in Figur 3 dargestellten Histogramme zeigen die Verteilungen der ermittelten Kreuzkorrelationsamplituden $f(t)$, die von Proben mit bzw. ohne Restriktionsendonukleaseaktivität unter Verwendung von leuchtenden unterschiedlichen Durchmessern erhalten wurden.

Figur 4 verdeutlicht den Einfluß der Substratkonzentration auf den Überlapp zwischen den Verteilungsfunktionen von Proben mit und ohne enzymatische Aktivität.

Figur 5 zeigt die Applikation des erfindungsgemäßen Verfahrens für ein simuliertes Hochdurchsatzscreening auf Restriktionsendonukleaseaktivität unter Bestimmung des Parameters $f(t)$.

Figur 6 verdeutlicht eine bevorzugte Ausführungsform des optischen Aufbaus unter Verwendung eines Zweiflächen-Fluoreszenzkreuzkorrelationspektrometers.

Fig. 7 zeigt wie durch das erfindungsgemäße Verfahren die Meßzeiten deutlich verringert werden können.

Fig. 8 zeigt den Einfluß der Meßzeit auf den Überlapp zwischen den Verteilungsfunktionen von Proben mit und ohne enzymatische Aktivität.

Fig. 9 zeigt schematisch ein Meßprinzip.

Fig. 10 zeigt die Bedeutung der zeitlichen Breite der Zeitanäle und der Frequenz der periodischen Relativbewegung für die Konzentrationanalyse.

Fig. 11 verdeutlicht eine bevorzugte Ausführungsform des optischen Aufbaus mit einer Vorrichtung zur Bewegung der Probe in Form einer Beaufschlagung mit Schwingungen.

Figur 1 zeigt typische Kreuzkorrelationskurven, die von Proben mit bzw. ohne Restriktionsendonukleaseaktivität bei verschiedenen Analysenzeiten erhalten wurden. Die Assays wurden unter Verwendung von 10 nM markiertem DNA-Substrat, welches für 3 Stunden bei 37 °C mit 0,25 U/ml EcoRI (untere dünne Linien) bzw. ohne Zusatz von Enzym (obere Linien in Fettdruck) inkubiert wurde, durchgeführt. Die Korrelationszeiten betragen 760 ms (gepunktete Linien) und 120 s (durchgezogene Linien). Die verwendete Leuchtquelle wies einen Durchmesser von 30 µm auf. Die Anregungsintensitäten betragen 19 kW/cm² (488 nm) bzw. 15 kW/cm² (633 nm). Die bei kurzen Analysenzeiten erhaltene Kreuzkorrelationskurve

ist veranschaulicht als die bei langen Analysenzeiten erhaltene Kreuzkorrelationskurve. Dennoch stimmen die charakteristischen Diffusionszeiten und Partikelgrößen hinreichend überein, um die Aussage zu erlauben, daß die erhaltenen Kurven dieselbe Information enthalten.

Figur 2 zeigt die Mittelwerte der jeweiligen einzelnen Kreuzkorrelationswerte τ und ihre Standardabweichungen, die von Proben mit bzw. ohne Restkationsendonukleaseaktivität erhalten wurden. Die Assays wurden unter Verwendung von 1 mM markiertem DNA-Substrat, welches für 3 Stunden bei 37 °C mit 0,25 U/µl EcoRI (untere dünne Linie) bzw. mit 0,25 U/µl HindIII (obere Linie in Fettdruck) inkubiert wurde, durchgeführt. Die Korrelationszeiten betragen 1,6 s. Die verwendete Leuchtblende wies einen Durchmesser von 30 µm auf. Die Anregungsintensitäten betragen 38 kW/cm² (488 nm) bzw. 31 kW/cm² (633 nm). Es zeigt sich, daß die Standardabweichungen bei τ -Werten unterhalb von 0,01 ms drastisch erhöht sind.

Die in Figur 3 dargestellten Histogramme zeigen die Verteilungen der evaluierten Kreuzkorrelationsamplituden G(0), die von Proben mit bzw. ohne Restkationsendonukleaseaktivität unter Verwendung von Leuchtblenden unterschiedlichen Durchmessers erhalten wurden. Die Balken bezeichnen die Anzahl der G(0)-Werte, die in einer Binbreite von 0,0015 (30 µm), 0,0026 (10 µm) bzw. 0,0062 (60 µm) liegen. Der Hauptteil der Abhängung zeigt die Verteilungsfunktionen von Proben mit (gepunktete Balken) bzw. ohne (durchgezogene Balken) enzymatische Aktivität bei optimalem Leuchtblendendurchmesser (30 µm). Der Überlapp zwischen den Gauß-kurven beträgt hier 0,6 %; Er beträgt 2,4 % bei einem Leuchtblendendurchmesser von 10 µm bzw. 3,4 %, bei einem Leuchtblendendurchmesser von 60 µm. Die Assays wurden unter Verwendung von 10 mM geladenem DNA-Substrat durchgeführt, welches für 3 Stunden bei 37 °C mit 0,25 U/µl EcoRI (gepunktete Balken) bzw. mit 0,25 U/µl HindIII (durchgezogene Balken) inkubiert wurde. Die Korrelationszeiten betragen 1,6 s. Die Anregungsintensitäten betragen 38 kW/cm² (488 nm) bzw. 31

kW/cm² (633 nm). Der ermittelte optimale Leuchtblendendurchmesser reflektiert offenbar den Kompromiß zwischen der Zunahme der Detektionseffizienz mit zunehmendem Leuchtblendendurchmesser (bedingt durch eine erhöhte Aufenthalt-dauer der Fluorophore im Fokus) und der Abnahme des Signal-Rausch-Verhältnisses mit zunehmendem Leuchtblendendurchmesser (bedingt durch einen erhöhten Fluoreszenzuntergrund).

Figur 4 verdeutlicht den Einfluß der Substratkonzentration auf den Überlapp zwischen den Verteilungsfunktionen von Proben mit und ohne enzymatische Aktivität. Die Assays wurden wie in der Legende zu Figur 3 beschrieben unter Verwendung eines Leuchtblendendurchmessers von 30 µm durchgeführt. Die Separation der Verteilungsfunktionen erhöhte sich mit zunehmender Konzentration

Figur 5 zeigt die Applikation des erfindungsgemäßen Verfahrens für ein simuliertes Hochdurchsatzscreening auf Restkationsendonukleaseaktivität. Die Proben wurden zyklisch gescreent (insgesamt 500 Messungen). Der linke Teil der Figur 5 zeigt die Verteilungsfunktionen von Proben mit (BarnHI, offene Balken) und ohne (HindIII, schwarze Balken) spezifische Endonukleaseaktivität bei Analysedauern von 760 ms (1a), 1,6 s (2a), 3,6 s (3a) und 7,6 s (4a). Die Verteilungsfunktionen der Kreuzkorrelationsamplituden G(0) wurden wie in der Legende zu Figur 3 beschrieben evaluiert. Die Binbreite betrug 0,0015. Der rechte Teil der Figur 5 verdeutlicht die Separationseffizienz des erfindungsgemäßen Verfahrens mittels Gauß-Fitting bei reinem Substrat (durchgezogene Linie), HindIII (durchgezogene Linie in Fettdruck), reinem Substrat (durchgezogene Linie), HindIII (durchgezogene Linie) und SspI (gepunktete Linie). Der Überlapp betrug 2,6 - 5,4 % (760 ms), 0,1 % (1,6 s), < (geschnittene Linie). Der Überlapp betrug 2,6 - 5,4 % (760 ms), 0,1 % (1,6 s), < (geschnittene Linie). Der Überlapp betrug 2,6 - 5,4 % (760 ms), 0,1 % (1,6 s), < (geschnittene Linie). Die Assays wurden in einem Volumen von 5 µl unter Verwendung von 10 mM geladenem DNA-Substrat durchgeführt, welches für 3 Stunden bei 37 °C mit 0,25 U/µl HindIII, 0,1 U/µl BarnHI, 0,25 U/µl EcoRI, 0,08 U/µl SspI bzw. ohne Zugabe von Enzymen inkubiert wurde. Die Anregungsinten-

studen betragen 19 kW/cm^2 (488 nm) und 15 kW/cm^2 (633 nm). Der Lochblechdurchmesser betrug $30 \text{ }\mu\text{m}$. Es zeigt sich, daß mit zunehmender Analysentiefe die Verteilungsfunktionen schmaler wurden und somit die Mittelwerte klar zu separieren sind.

Figur 6 zeigt den optischen Aufbau eines Zweifarben-Fluoreszenz/kontrolltunsspektrometers. Zwei parallele Laserstrahlen eines Argon-Ionen-lasers (488 nm) und eines Helium-Neon-lasers (633 nm) passieren ein Wassermessionsobjektiv ($40\times$, N.A. 1.2) in einem Ipi-Fluorimensionsaufbau, so daß die zwei inebeneinanderliegenden Foci in der Probe ein korrekales Meltrivolumen in der Endenordnung von Femtolitern bilden. Das emittierte Fluoreszenzlicht wird durch das Mikroskopobjektiv gesammelt, mittels dichroitischem Spiegel vom Anregungsstrahlengang separiert und mittels einer Linse auf eine Lochblech fokussiert. Die Lochbleche variablen Durchmessers ist in der Blende der Linse angeordnet und kann in x-, y- und z-Richtung justiert werden. Die Fluoreszenzmission wird parallelisiert durch einen dichroitischen Spiegel in eine grüne und rote Fraktion separiert und auf zwei Avalanche-Photodioden refokussiert.

In Figur 7 wurde eine Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens eingeführt, welche zu einer gesteuerten Bewegung der Probe bei stationärer Optik in Form einer Beschleunigung von Schwingungen verwendet wurde. Hierzu wurde der Probenhalter an einen piezoelektrischen Positronenstrom montiert und entsprechend oxidiert. Es wurden Proben eingesetzt, die 10 nM doppeltsträngiges DNA-Substrat enthielten und deren Ferner in einer Ausfaltungsmessung Restriktionsendonuklease FokI zugesetzt wurde oder in einer anderen Ausfaltungsmessung kein solches Enzym zugesetzt wurde. Der obere Teil der Abbildung zeigt, daß bei einer Analysentiefe von 50 ns (je 3900 Messungen, Frequenzen 75 Hz (x) und 49 Hz (y)) ein Überlapp zwischen Signalen der beiden verschiedenen Probentypen von ca. 3% erzielt werden konnte. Im unteren Teil der Abbildung zeigt sich, daß bei einer Analysentiefe

von 100 ns (je 1800 Messungen, Frequenzen 75 Hz (x) und 49 Hz (y)) ein Überlapp von sogar nur 0.4% erzielt werden konnte. Somit ist deutlich gezeigt, daß unter Anwendung einer erzwungenen Bewegung der fluoreszierenden Partikel eine Verkleinerung der Meltrivolumen und eine erhöhte Darlegungsgenauigkeit erreicht werden kann.

In Figur 8 sind Histogramme aus jeweils 300 Messungen des Kontrastwertes für Proben aus reinem Substrat (10 nM zweifach markierte Doppelsträng-DNA, schwarze Balken) und bereits durch Restriktionsendonuklease geschnittene Probe (10 nM zweifach markierte Doppelsträng-DNA, gepunktete Balken) bei einer Oszillationsfrequenz von 216 Hz dargestellt. Die Abbildungen A-D zeigen verschiedene Analysenvarianten. Die Verteilungen wurden durch eine Gaußfunktion angefitzt; zur Bestimmung des Mittelwerts wurden die Standardabweichungen und der Überlapp der Fittungskurven bestimmt.

Figur 9 illustriert schematisch ein Meltrivolumen. In der linken Spalte diffundieren unterschiedliche Farbstoffe unabhängig durch die Probenlösung. Das jeweilige Auftreten eines Farbstoffes im Meltrivolumen ist daher unabhängig von dem Verteilungszustand des Farbstoffes, und die Photonenereignisse in einer Zeitspur sind den anderen Farbstoffen, und die Photonenereignisse von den Photonenereignissen, die statistischer Natur und vollkommen unabhängig von den Photonenereignissen, die in der anderen Zeitspur aufgenommen werden. Der Kontrastwert in solch einem Falle ist genau $K=1$. In der rechten Spalte sind beide Farbstoffe aneinander gebunden und diffundieren nun gemeinsam durch die Probenlösung. Tritt der Komplex im Meltrivolumen auf, so werden in den beiden Meltrispuren zeitgleich (d.h. im selben Zeitraum n) Photonenereignisse registriert. Diese Abhängigkeit der Signale aus den unabhängigen, spektral getrennten Detektoren führt zu einer Halbierung von Kontrastwerten (d.h. zeitgleich registrierten Photonen), welche über das statistische Maß voranhand unabhängiger Signale hinausgehen. Der Kontrastwert in solch einem Falle beträgt $K=1/2$. Je höher der Anteil von miteinander verbundenen verschickten Farbstoffen ist, desto mehr unterscheidet sich K von 1 .

In Figur 10 ist die Deckkonssistenz in Abhängigkeit von der zeitlichen Breite der Zeitskanäle (a) und der periodischen Relativbewegung (b), welcher Proben- und Meßvolumen unterworfen werden, dargestellt. Um geeignete Wertebereiche dieser Parameter zu bestimmen, wurde eine Testprobe verwendet (10 mM mit den Farbstoffen Rhodamine Green und Cy5 zweifach markierte dextran) und für verschiedene Wirkkonzentrationen je 300 unabhängige Messungen mit einer Meßzeit von je 500 ms durchgeführt. Als Maß für die Deckkonssistenz einer Probe mit zweifach markierten Molekülen richtig zu charakterisieren, wurde die relative Standardabweichung $\sigma/\Delta x$, aus der ausgeprägten Gaußverteilung abgeleitet. Sie gibt das Verhältnis aus der Standardabweichung σ und dem Abstand Δx zwischen dem Verteilungszentrum (x_0) und dem Zentrum, welches eine Verteilung besitzen würde, die eine Meßprobe ohne jegliche zweifach markierte Moleküle beschreibt ($x_0 = 1$) an. Kleines $\sigma/\Delta x$ bedeutet hierbei einen kleinen Überlapp zwischen einer „positiven“, Verteilung und einer „negativen“, Verteilung und somit eine erhöhte Deckkonssistenz. In Abbildung 10 (a) ist $\sigma/\Delta x$ für unterschiedliche zeitliche Breiten der Zeitskanäle aufgetragen. Ein Plateau minimaler relativer Standardabweichung bildet sich bei mittleren Werten der Zeitskanalbreite. Bei Zeitskanalbreiten im Bereich der Tropfzeitansatz-Lebensdauer der Farbstoffmoleküle liegen ($< 5 \mu s$), steigt $\sigma/\Delta x$ an. Ebenso steigt $\sigma/\Delta x$ an, wenn die Zeitskanalbreite in den Bereich der mittleren Durchstrichzeit der Moleküle durch das Meßvolumen kommt. Allerdings kann bei Erhöhung der Frequenz der Relativbewegung diese obere Grenze an Zeitskanalbreiten herabgesetzt werden. Abb. 10b zeigt die Abhängigkeit der relativen Standardabweichung $\sigma/\Delta x$, von der Frequenz der Relativbewegung zwischen Probenvolumen und Meßvolumen (Es ist immer die y-Frequenz angegeben. Ist diese nicht Null, geht sie immer mit einer Frequenz von 3 Hz in x-Richtung einher). Es sind Kurven für verschiedene Meßzeiten aufgetragen, die Kanalbreite beträgt 12,5 μs . Bei einer nur geringen Frequenz der Relativbewegung ist schon ein sehr starker Abfall der relativen Standardabweichung zu sehen. Der Kurvenverlauf zeigt

eine moderate Verkleinerung von $\sigma/\Delta x$ bei zunehmender Frequenz. Im Bereich von 3-246 Hz wird $\sigma/\Delta x$ nochmals um etwa einen Faktor 2 verringert, wobei bei der Ableitung von noch höheren Frequenzen noch weitere Verkleinerungen zu erwarten sind. Die relativen Standardabweichungen nehmen mit zunehmender Meßzeit ab.

Figur 11 zeigt den optischen Aufbau eines Zweifachen Fluoreszenzkonfokalaufbaus. Parallel Laserstrahlen des hohen in Form einer homogenen Lichtquelle mit Schwingungen. Parallel Laserstrahlen eines Krypton-Ionen-Lasers mit den Wellenlängen 476/483 nm und 647 nm passieren ein Wassermineralölobjektiv (60x, N.A. = 1,2) in einem Epifluorometeraufbau. Der Probenhalter ist mit einem zweidimensional beweglichen Piezoelement verbunden, welches wiederum auf einem mechanischen Hochpräzisions-x-y-Zerschneidungsmontiert ist. Das emittierte Fluoreszenzlicht wird durch das Mikroskopobjektiv gesammelt, mittels dichroitischem Spiegel vom Anregungsstrahlengang separiert und mittels einer Linse auf eine Lochblende fokussiert. Die Lochblende variiert Durchmesser ist in der Bildenebene der Linse angeordnet und kann in x-, y- und z-Richtung justiert werden. Die Fluoreszenzmission wird parallelisiert, durch einen dichroistischen Spiegel in eine grüne und rote Fraktion separiert und auf zwei Avalanche-Photodioden reflektiert.

Anführungsbeispiel 1

Verwendete Materialien:

Typ II Restriktionsendonukleasen (E.C. 3.1.21.4) EcoRI (25 U/µl), BamHI (10 U/µl), SspI (8 U/µl) und HindIII (25 U/µl) wurden von der Fa. Strategene (La Jolla, CA) erworben, die Endonukleasen sind in Klammern angegeben. Fluoreszenzmarkierte 66 nt Oligonukleotide Cys-

ATGGCTTAATGACGACGATAGCGAGATCGGAA

TTGCTATATGGTATCTACGGCTTCGCTCGATAC und

GATACGAGCGCAAGACCTTGAGGTCACCAATATGAACTGGATCTCAT

TCCTGCTCATTTACCAT wurden durch die Fa. MWG-Biotech (Ebersberg,

Deutschland) synthetisiert und 100 µg/gewichte, das erste Oligonukleotid weist am 5'-Terminus als Fluoreszenzmarker Cys (Anerkennung, UK) auf, während das zweite

Oligonukleotid am 3'-Terminus Green RBE (Molekular Probes) getaggt ist. Bei Hybridisierung der beiden komplementären Stränge ergeben sich Erkennungstellen für BamHI (einfach unterstreichen), EcoRI (doppelt unterstreichen) und SspI

(gepunktet). Die Hybridisierung der komplementären Stränge erfolgte bei Konzentrationen von 1 µM in 100 mM KOAc, 25 mM Tris-Acetate, pH 7,6, 10 mM MgOAc, 0,5 mM β-Mercaptoethanol, 10 µg/ml BSA unter Erhitzen der Lösung auf

94 °C und anschließendes Abkühlen auf 23 °C mit einem Temperaturgradienten von 1,2 °C/min. Als Resultat entstand ein zweifach-markierter DNA-Doppelstrang mit

Erkennungssstellen für BamHI, EcoRI und SspI.

Fluoreszenz-Restriktionsendonuklease-Assay:

Endonuklease-Assays wurden für 3 Stunden bei 37 °C durchgeführt. Der Reaktionspuffer enthielt 150 mM KOAc, 175 mM Tris-Acetate, pH 7,6, 15 mM MgOAc, 0,75 mM β-Mercaptoethanol, 515 µg/ml BSA, 0,05 % Triton X-100, 0,5 % Glycerol, 1 - 20 mM geladenes DNA-Substrat und unterschiedliche Anteile (0/0,8 - 0,25/10

µl) an Restriktionsenzymen BamHI, EcoRI, SspI und HindIII

Christlicher Aufbau:

Die Messungen erfolgten unter Verwendung eines Zweifarbigen-Fluoreszenzspektrometers (Dual-color Confocal, C. Zeiss, Oberkochen, Deutschland). Das konstante Methvolumen von 0,44 µl wurde durch Überlagerung der Foci eines Argon-Ionen-Lasers (488 nm) und eines Helium-Neon-Lasers (633 nm) gebildet. Die Fluoreszenzmissionssignale wurden separat unter Verwendung von gelblicher Avalanche-Photodioden detektiert, im Emissionsstrahlengang befand sich eine zwei Kanäle angeordnete Lochblende. Das Spektrometer war mit einem Thermosonden-angesaugen. Der Fokus wurde 100 µm über dem Boden des jeweiligen Probengefäßes positioniert. Die Medientemperatur betrug 22 °C. Die Proben wurden in Probenträgern im Mikrotiterplattenformat vorgelegt. Hierfür handelte es sich entweder um kontaminationsfreien verschlossenen Plastikfolien (Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie) oder um kommerzielle Deckglaskammern (Nunc, Denmark).

Kreuzkorrelationsanalyse:

Der theoretische Hintergrund der Kreuzkorrelationsanalyse wurde detailliert von Schwille et al. (Biophys. J. 72, 1878 - 1886, 1997) beschrieben. Auf den Offenbarungsgutachten dieser Publikation wird Bezug genommen. Die Daten der Kreuzkorrelationsanalyse wurden unter Verwendung eines dreidimensionalen Modells für einzelne diffundierende Partikel evaluiert (Reiger und Widengren, Bioessence 3, 180 - 183, 1990).

$q(t)$ bezeichnet die Korrelationsumplitude bei $\tau = 0$, welche proportional zur Konzentration zweifach-gepulster Moleküle im zylinderförmigen Meßvolumen des Radius r_0 und der halben Länge z_0 ist. Der Parameter τ_{fast} stellt gemäß der Gleichung $\tau_{\text{fast}} = \tau_0/2$ in einem umgekehrt proportionalen Zusammenhang zum Diffusionskoeffizienten D . Die experimentellen Daten wurden unter Anwendung des Access 2.0 Programms der IFA FV101/EC Biosystems GmbH mittels nicht-linearem Least-square Marquardt-fit prozessiert. $q(t)$ war der einzige freie Parameter bei der Evaluierung der Kreuzkorrelationsmessungen. Der Strukturparameter z_0/r_0 wurde mittels Autokorrelationsmessungen an freier Farbstofflösung ermittelt; die durchschnittliche Diffusionszeit τ_{diff} des Substrates wurde mittels einer 60 s Messung ohne Zusatz von Inertin bestimmt. Beide Parameter wurden im Fitting der Kreuzkorrelationsdaten vorgegeben.

Statistische Evaluierung:

Ein typisches Set Kreuzkorrelationsmessungen enthielt 100 Kurven, welche unter Verwendung von Akkumulationszeiten zwischen 760 ms und wenigen Sekunden aufgenommen wurden. Aus jedem Set wurde die Amplitude $Q(t)$, welche mittels Fitting erhalten wurde, in einem Histogramm aufgetragen (Details siehe Figur 3). Die Analyse ergab, daß die $Q(t)$ -Verteilungsfunktionen mittels Gauß-Funktion approximiert werden können. Die Mittelwerte der Gauß-Funktionen korrespondieren mit den durchschnittlichen Konzentrationen der Fluorophore, während die Standardabweichungen die Streuung der einzelnen Messungen widerspiegeln. Ein ein Maß für die Unschärfe der Verteilungsfunktionen zu erhalten, wurde die Überlappungsfläche der gefitteten Gauß-Funktionen durch Integration der Gauß-Funktionen ermittelt. Die Überlappungsflächen wurden standardisiert, so daß ein 100 % Überlapp Gauß-Funktionen mit identischem Mittelwert und identischer Standardabweichung entspricht.

Ausführungsbeispiel 2

Verwendete Materialien:

Die verwendeten Materialien und Versuchsbedingungen entsprachen im wesentlichen in dem Ausführungsbeispiel 1 angegebenen. Allerdings wurde hier als Resinkomondoklease nur EcoRI verwendet.

Homogener Resinkomondoklease-Assay:

Die Endoklease-Assays wurden für EcoRI gemäß Ausführungsbeispiel 1 durchgeführt. Als Referenz wurde eine Probe, der keine Resinkomondoklease zugesetzt wurde, verwendet.

Optischer Aufbau:

Der Experimentelle Aufbau ist in Abbildung 11 dargestellt. Fluoreszenzanregung erfolgte durch Epi-Illumination eines Wasserminionsobjektives (JPL-AP0 60x1.2W/Objympus, Japan) mit den Wellenlängen 476/483 nm und 647 nm eines Krypton-Ionen-Lasers (INNOVA 90-K; Coherent, Palo Alto, USA), der im Multimodus betrieben wurde. Der diatomische Strahlleiter A (AHP, Analysentechnik, Tübingen) reflektiert bei <502 nm und 585-655 nm und transmittiert bei 502-585 und >655nm. Zusätzliche Lasertinnen bei 531 nm und 568 nm werden mit einem speziell angefertigten Anregungs-/Notch-Filter (<OD 5; AHP, Analysentechnik) entfernt. Angepaßte relative Laseranregungsenergien für beide Wellenlängen erhält man durch die Kombination eines Farblinse-Absorptionsfilters (BG 40, Andover Corporation, Salem, USA) und eines Abschwächungsfilters (OD 0.6, Spindler & Hoyer, Göttingen). Die Proben wurden in kommerziellen Deckglaskammern vorgelegt (Nunc, Denmark). Der Probenhalter ist mit einem zweidimensional beweglichen Piezostellenelement (Piezosystem Jena) verbunden, welches wiederum auf einem mechanischen Hochpräzisions-x-y-Zerschiebestisch (Marzhauser, Weiden) montiert ist. Die Fluoreszenzphotonen werden an diatomischen Strahlleiter B

spektrel separiert (SSSDC1 M2 Omega Optical, Brattleboro, USA) und nach optischer Filterung im roten (667nm LP Omega) und grünen Kanal (SSSDC45 Omega) auf zwei Avalanche-Photodioden (APD) abgebildet (SPCA-AQ 131-ES, EG&G Optoelectronics, Kanada). Die digitalen Pulse der APDs werden entweder von einer Dual input Multibitler PC-Karte (MCD+, FAST Control, München) für die Analyse von Zeitspurpaaren mit hoher zeitlicher Auflösung oder von einer on board- Prozessor PC-Karte (Adwin II D, Jäger Meßtechnik, Lorsch), welche für eine Online-Datenvorverarbeitung programmiert werden kann, aufgenommen.

Konzidenzanalyse:

Zur Ermittlung der Konzentration wurden die Photonenzahlspalte der beiden Detektoren von einer Multikarte simultan aufgenommen und simultan mit einer wählbaren Zeitanalysezeit gescannt. Von den so erhaltenen zwei Zeitspurpaaren wurden nun jeweils zueinander die Kanäle miteinander multipliziert, dann die Summe über alle Produkte gebildet, und für eine Normierung durch beide Zeitspur (Einzelsummen) geteilt und mit der Zeitanalysezeit (Gesamtzahl) multipliziert:

$$K(n) = \frac{\sum_{i=1}^n N_i(n) N_i(n)}{\sum_{i=1}^n N_i(n) \sum_{i=1}^n N_i(n)}$$

wobei in den Index des jeweiligen Zeitanalyse (nach aufsteigender Zeit geordnet), n die Gesamtzahl der in einer Zeitspur enthaltenen Zeitanalyse, $N_i(n)$ die Anzahl der Photonenzahlereignisse in Zeitspur 1 in Zeitanalyse i und $N_j(m)$ die Anzahl der Photonenzahlereignisse in Zeitspur 2 in Zeitanalyse m anzeigt.

Anweisung

Der erhaltene Wert K ist das Bewertungsmaß für die betrachtete Probe. Es wird lediglich die Anzahl der konzentrierten Ereignisse bewertet. Für total voneinander unabhängige Signale ist K wegen der Normierung 1. Treten Photonenpaare in beiden Zeitspurpaaren über das Zufallsmaß hinausgehend gehäuft zeitgleich auf, ist $K > 1$. Je höher K über 1 liegt, desto mehr Konzentration, d.h. zeitgleich registrierte Photonen, in den beiden Zeitspurpaaren treten auf. Letzteres ist ein Maß für den gemeinsamen Anteil der Moleküle, an welche beide Farbstoffspezies gebunden sind.

Statistische Auswertung

Es wurde ebenfalls eine Statistik über die Konzentrationen aufgestellt. Es wurde hierfür eine Statistik über die Konzentrationen aufgestellt. Die in je 300 Messungen von Proben aus reinem Substrat und je 300 Messungen von bereits durch Reaktionsionsomulase geschützten Proben bei einer Oszillationsfrequenz von 216 Hz und unterschiedlichen Analysenzeiten ermittelten Konzentrationen wurden in einem Histogramm aufgetragen (siehe Figur 8). Die Analyse ergab, daß die Konzentrationen durch eine Gauß-Funktion approximiert werden können. Die Mittelwerte der Gaußfunktion verringern um 1 korrespondieren mit den durchschnittlichen Konzentrationen an zweifach gebundenen Substrat, während die Standardabweichungen die Streuung der einzelnen Messungen widerspiegeln. Um ein Maß für die Unterschiedlichkeit der Verteilungsfunktionen zu erhalten, wurde die Überlappungsfläche der gefüllten Gauß-Funktionen durch Integration der Gauß-Funktionen ermittelt. Die Überlappungsflächen wurden standardisiert, so daß ein 100 % Überlapp Gauß-Funktionen mit identischen Mittelwert und identischer Standardabweichung entspricht.

ANSPRÜCHE

1. Verfahren zum Nachweis von Assoziations-, Dissoziations-, Verknüpfungs- oder Spaltreaktionen sowie Konformationsänderungen von Analyten in einer Probe mittels Konfidenzanalyse, wobei
 - die Probe mindestens zwei mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markierte
 - Analyse untlöder mindestens einen mit mindestens zwei unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markierten Analyten enthält,
 - die Probe zur Anregung der Fluoreszenzemission der mindestens zwei Farbstoffe von mindestens einem Laser beleuchtet wird,
 - die von der Probe ausgehenden, aus mindestens einem Meßvolumenelement V stammenden Fluoreszenzsignale mittels mindestens zweier Detektionseinheiten detektiert werden,
 - die jeweils in den Detektionseinheiten detektierten Signale oder hiervon abgeleitete Zeitspektren in beliebiger, im wesentlichen jedoch simultaner, Zeitebene mit frei wählbaren Zeitkoinzidenzen zerlegt werden,
 - die Anzahl der in mindestens einem Zeitebschnitt enthaltenen Signale untlöder die Zeitintervalle zwischen Signalen in den Zeitebschnitten ermittelt werden,
 - für mindestens einen Zeitebschnitt der ersten Detektionseinheit eine Konfidenzanalyse der ermittelten Daten mit mindestens einem im wesentlichen zeitgleichen Zeitebschnitt der zweiten Detektionseinheit durchgeführt wird
 - mindestens eine Statistik der Resultate der Konfidenzanalyse erstellt wird, untlöder die Resultate einer Schwellwertanalyse unterzogen werden,
 - diese oder mindestens eine Kombination mehrerer Statistiken nach dem Vorhandensein von Metriken, welche für eine Assoziations-, Dissoziations-, Verknüpfungs- oder Spaltreaktion oder Konformationsänderungen charakteristisch sind, bewertet wird

2. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Zeitebschnitte größer als die halbe Fluoreszenzlebensdauer der mindestens zwei Farbstoffe sind
3. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 untlöder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Zeitebschnitte kleiner als die Durchstrichzeit des mindestens einen Probemoleküls durch das Meßvolumen sind
4. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Detektionseinheiten unterschiedliche optische Detektionsempfindlichkeiten aufweisen
5. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Meßvolumenelement $V \leq 10^{-12}$ l ist
6. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Probe von mindestens einem Laser beleuchtet wird, der elektromagnetische Strahlung mindestens einer Wellenlänge emittiert, die geeignet ist, die mindestens zwei Farbstoffe anzuregen
7. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Konfidenzanalyse online durchgeführt wird
8. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Zeit zur Durchführung der jeweiligen Messung während der Messung individuell angepaßt wird

9. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß im Rahmen der Konzentranalyse die Konzentration durch die Amplitude $G(t)$ der Kreuzkorrelation ermittelt wird.

10. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß im Rahmen der Konzentranalyse die Konzentration durch logische UND-Verknüpfung ermittelt wird.

11. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Konzentration durch Multiplikation gemäß nachfolgender Formel ermittelt wird:

$$K(n) = \frac{\sum_j \prod_i N(m_{ij})}{\prod_j \sum_i N(m_{ij})} \quad n \neq 0$$

wobei $N(m_{ij})$ die Anzahl Photonen im Zeitelement m des Detektors j , i die Gesamtzahl der verwendeten Detektorelementen und n die Anzahl der Zeitelemente innerhalb der Zeitspur bezeichnet.

12. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß Probenvolumen und Maßvolumen relativ zu einander bewegt werden.

13. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß Systeme untersucht werden, in denen Partikel auftreten, deren Molekulargewicht sich um weniger als den Faktor 2 unterscheidet.

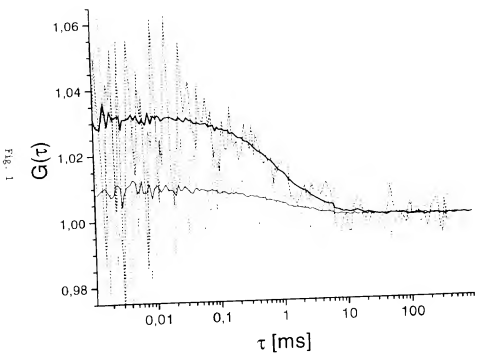


Fig. 1

2/11

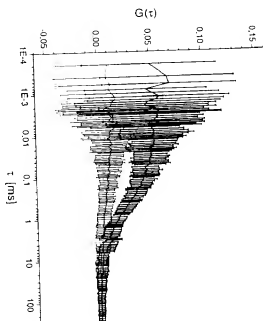


Fig. 2

EINSATZBLATT (REGEL 26)

3/11

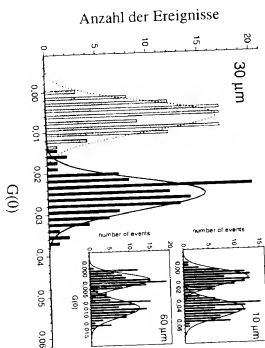


Fig. 3

EINSATZBLATT (REGEL 26)

4/11

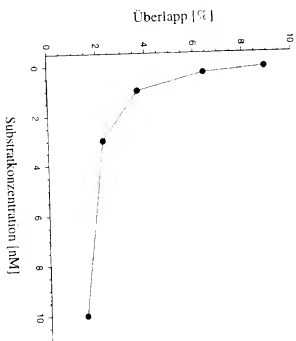


Fig. 4

ERSATZBLATT (REGEL 26)

5/11

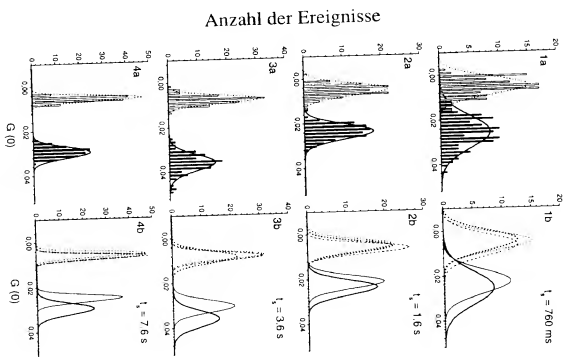


Fig. 5

ERSATZBLATT (REGEL 26)

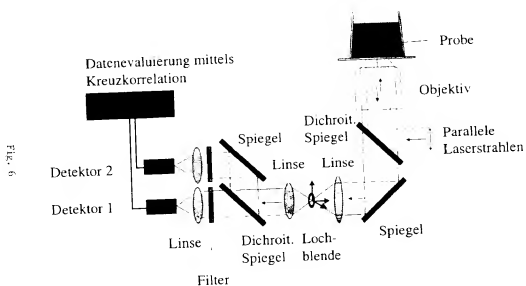


Fig. 6

ERSATZBLATT (REGEL 28)

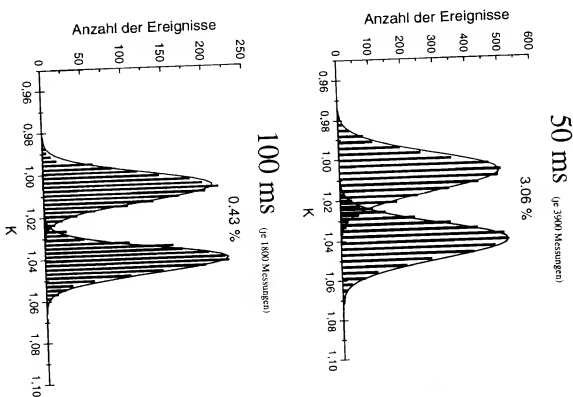


Fig. 7

ERSATZBLATT (REGEL 28)

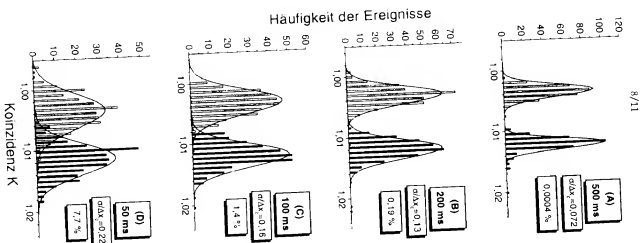


FIG. 8

ERSATZBLATT (REGEL 26)

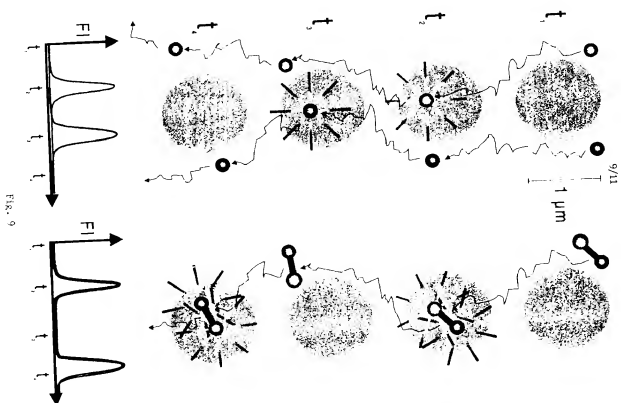


FIG. 9

ERSATZBLATT (REGEL 26)

10/11

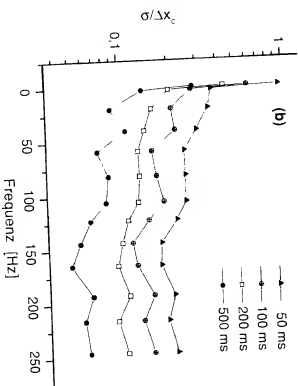
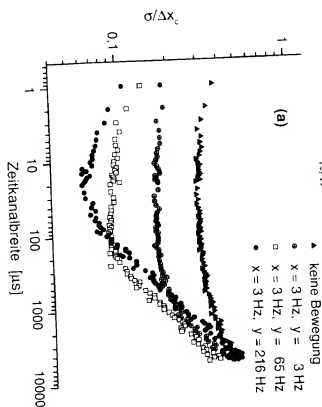


Fig. 10

ERSATZBLATT (REGEL 26)

11/11

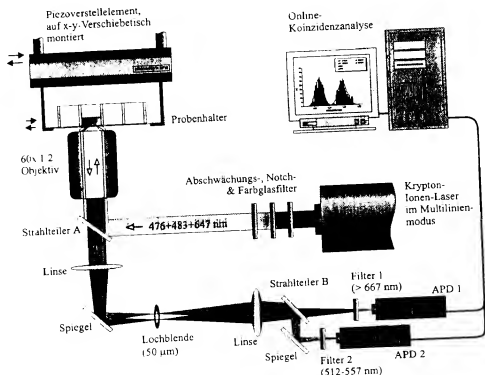


Fig. 11

ERSATZBLATT (REGEL 26)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

IPC 6 G01N 1/04

IPC/EP 98/0845

IPC 6 G01N 1/04

IPC 6 G01N 1/04

IPC 6 G01N 1/04

IPC 6 G01N 1/04

IPC 6 G01N 1/04

IPC 6 G01N 1/04

IPC 6 G01N 1/04

IPC 6 G01N 1/04

IPC 6 G01N 1/04

IPC 6 G01N 1/04

IPC 6 G01N 1/04

IPC 6 G01N 1/04

IPC 6 G01N 1/04

IPC 6 G01N 1/04

IPC 6 G01N 1/04

IPC 6 G01N 1/04

IPC 6 G01N 1/04

IPC 6 G01N 1/04

IPC 6 G01N 1/04

IPC 6 G01N 1/04

IPC 6 G01N 1/04

IPC 6 G01N 1/04

IPC 6 G01N 1/04

IPC 6 G01N 1/04

IPC 6 G01N 1/04

IPC 6 G01N 1/04

IPC 6 G01N 1/04

IPC 6 G01N 1/04

IPC 6 G01N 1/04

IPC 6 G01N 1/04

IPC 6 G01N 1/04

IPC 6 G01N 1/04

IPC 6 G01N 1/04

IPC 6 G01N 1/04

IPC 6 G01N 1/04

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

IPC/EP 98/0845

IPC 6 G01N 1/04

IPC 6 G01N 1/04

IPC 6 G01N 1/04

IPC 6 G01N 1/04

IPC 6 G01N 1/04

IPC 6 G01N 1/04

IPC 6 G01N 1/04

IPC 6 G01N 1/04

IPC 6 G01N 1/04

IPC 6 G01N 1/04

IPC 6 G01N 1/04

IPC 6 G01N 1/04

IPC 6 G01N 1/04

IPC 6 G01N 1/04

IPC 6 G01N 1/04

IPC 6 G01N 1/04

IPC 6 G01N 1/04

IPC 6 G01N 1/04

IPC 6 G01N 1/04

IPC 6 G01N 1/04

IPC 6 G01N 1/04

IPC 6 G01N 1/04

IPC 6 G01N 1/04

IPC 6 G01N 1/04

IPC 6 G01N 1/04

IPC 6 G01N 1/04

IPC 6 G01N 1/04

IPC 6 G01N 1/04

IPC 6 G01N 1/04

IPC 6 G01N 1/04

IPC 6 G01N 1/04

IPC 6 G01N 1/04

IPC 6 G01N 1/04

IPC 6 G01N 1/04

IPC 6 G01N 1/04

IPC 6 G01N 1/04

IPC 6 G01N 1/04

IPC 6 G01N 1/04

IPC 6 G01N 1/04

IPC 6 G01N 1/04

IPC 6 G01N 1/04

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent laws and regulations

Date of publication
PCT/EP 96/08425

Number of sheets

Publication
date

Priority date

Publication
date

Number of sheets	Publication date	Priority date	Publication date
EP 0885683 A	16-12-1998	WO 9851350 A	17-12-1998
EP 0359661 A	21-03-1990	DE 68924749 0	14-12-1995
		JP 2193043 A	30-07-1996
		US 5592861 A	02-08-1997
		US 5426607 A	18-07-1995
EP 0836090 A	15-04-1998	AU 5118398 A	11-05-1998
		WO 9816814 A	23-04-1998

INTERNATIONAL RECHERCHEBERICHT

Date of publication
PCT/EP 96/08425Number of sheets
178 6 01/11/94Number of sheets
178 6 01/11/94Number of sheets
178 6 01/11/94Number of sheets
178 6 01/11/94Number of sheets
178 6 01/11/94Number of sheets
178 6 01/11/94Number of sheets
178 6 01/11/94Number of sheets
178 6 01/11/94Number of sheets
178 6 01/11/94

EP 0 884 583 A (ELECTRIC BIOSYSTEMS)
 16. December 1998
 siehe Seite 2, Zeile 14 - Zeile 48
 siehe Seite 3, Zeile 40 - Seite 4, Zeile 4
 siehe Seite 3, Zeile 49 - Seite 4, Zeile 4
 siehe Seite 5, Zeile 14
 siehe Seite 5, Zeile 56 - Seite 6, Zeile 1
 siehe Seite 6, Zeile 30 - Zeile 40
 siehe Abbildungen 1, ...
 EP 0 359 681 A (UNIVERSITY OF ARKANSAS)
 21. März 1990
 siehe Seite 2, Absatz 1
 siehe Seite 4, Zeile 24 - Zeile 35
 siehe Seite 10, Zeile 3 - Zeile 15
 siehe Anspruch 7, Abbildung 6

-/-

Number of sheets
178 6 01/11/94Number of sheets
178 6 01/11/94Number of sheets
178 6 01/11/94Number of sheets
178 6 01/11/94Number of sheets
178 6 01/11/94Number of sheets
178 6 01/11/94Number of sheets
178 6 01/11/94Number of sheets
178 6 01/11/94Number of sheets
178 6 01/11/94Number of sheets
178 6 01/11/94Number of sheets
178 6 01/11/94Number of sheets
178 6 01/11/94

Seite 1 von 2

